

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



This is to certify that the annexed is a true copy of
the following application as filed with this Office.

Date of Application: February 20, 2001

Application Number: Japanese Patent Application
No. 2001-043306

Applicant(s): Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

October 26, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo Oikawa (seal)

Certificate No. 2001-3093453

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

J1017 U.S. PTO
10/077163
02/15/02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 2月20日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-043306

出 願 人
Applicant(s):

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

2001年10月26日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2001-3093453

【書類名】 特許願

【整理番号】 12B033

【提出日】 平成13年 2月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/566

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション反応法及びハイブリダイゼーション器具

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 佐藤 恵一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 8 1 番地 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社内

 【氏名】 森田 敏樹

【特許出願人】

 【識別番号】 000233055

 【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100110191

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 中村 和男

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 015244

特 2 0 0 1 - 0 4 3 3 0 6

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション反応法及びハイブリダイゼーション器具

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル生体高分子を含むサンプル溶液をカバーガラスに滴下するステップと、

プローブ生体高分子が固定されているスライドガラスを該プローブ生体高分子が固定されている面を下にして上記カバーガラスに載置するステップとを備えることを特徴とするハイブリダイゼーション反応法。

【請求項2】 サンプル溶液を滴下する前に、シリコン製のシートの上に前記カバーガラスを載置するステップをさらに備えることを特徴とする請求項1記載のハイブリダイゼーション反応法。

【請求項3】 生体高分子を固定したスライドガラスを載置する溝を上面に有するトレー部と、

前記溝にカバーガラスを固設するためのシートと、

前記トレー部を収容するケース部と、

前記ケース部とで前記トレー部を密閉するキャップ部とを備えることを特徴とするハイブリダイゼーション器具。

【請求項4】 前記シートは、シリコン製であることを特徴とする請求項3記載のハイブリダイゼーション器具。

【請求項5】 前記シートは、前記溝と長手方向の長さがほぼ同じであることを特徴とする請求項3又は4記載のハイブリダイゼーション器具。

【請求項6】 前記シートは、前記カバーガラスを載置する位置を示すガイドラインを有することを特徴とする請求項3乃至5いずれかに記載のハイブリダイゼーション器具。

【請求項7】 生体高分子を固定したスライドガラスを載置する凸部を上面の溝の中に有するトレー部と、

前記トレー部を収容するケース部と、

前記ケース部とで前記トレー部を密閉するキャップ部と

を備えることを特徴とするハイブリダイゼーション器具。

【請求項 8】 前記凸部は、カバーガラスを載置する位置を決めるカバーガラス固定溝を有することを特徴とする請求項 7 記載のハイブリダイゼーション器具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サンプル生体高分子とプローブ生体高分子とのハイブリダイゼーション反応を利用してサンプル生体高分子に目的とする配列が存在するか否かを分析するためのハイブリダイゼーション反応法及びハイブリダイゼーション器具に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来から、生体内の分子を同定・分画するために、特に目的 DNA の検出、あるいは遺伝子 DNA の有無検出などのために、既知の配列をもつ核酸や蛋白質をプローブとしてハイブリダイズする方法が多く用いられている。具体的には、まずプローブ DNA を固定したスライドガラスの上に、蛍光物質を標識したサンプル DNA を含む溶液を滴下し、つぎにその上にカバーガラスをかぶせてハイブリダイズさせて、サンプル DNA がプローブ DNA に結合すると、サンプル DNA はプローブ DNA と一緒に固定されるので、スライドガラスを洗浄した後に、固定されたサンプル DNA に標識されている蛍光物質を光源からの励起光で励起し、発光する蛍光を検出することでハイブリダイズしたサンプル DNA を検出することができる。

このハイブリダイゼーション反応を行うのに好適なハイブリダイゼーション器具として、ハイブリダイゼーション反応恒温槽 CHBIO に用いられる専用カセットが知られている（日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社製）。

【0003】

図 3 は、従来のハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。本器具は、ケース部 1 とトレイ一体型キャップ部 2 とを主な構成とする（挿入体と被挿入

体)。トレー一体型キャップ部2は、スライドガラスを載せるためのトレー部4と、密閉度を高めるためのシリコンゴム等からなるパッキン5を有する。ケース部1とトレー一体型キャップ部2は、とめ具3により一体化でき、ケース部1とトレー一体型キャップ部2とで密閉空間を形成するように構成されている。

【0004】

図4は、一体化した状態のハイブリダイゼーション器具の概観を示す図である。図3と同じ部分には同じ符号を付けてある。一体化した状態で実際の全体の大きさは、 $94 \times 41 \times 13 \text{ mm}^3$ である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

カバーガラスを載せるのは少ないサンプル溶液で効率的なハイブリダイゼーション反応をさせるためであるが、カバーガラスは極めて薄くて軽く、スライドガラス上に滴下したサンプル溶液の上にカバーガラスをかぶせて定位置に固設する作業は経験と技術を要するものである。最悪の場合にはカバーガラスを破損して貴重なサンプルを台無しにしてしまうこともある。

【0006】

また、上述のようにサンプル溶液は少量であり、ハイブリダイゼーション反応は比較的高温で行うので、サンプル溶液が蒸発してしまい、サンプル溶液が蒸発して残ったサンプルDNAは、洗浄しても容易に流されずに残ってしまうため、蛍光物質で解析する際に、ノイズとなって現れてしまう。

本発明は、上記問題点に鑑み、誰にでも容易に確実にセットすることができて、かつ、サンプル溶液の蒸発を少なくすることができるハイブリダイゼーション反応法及びハイブリダイゼーション器具を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明のハイブリダイゼーション反応法は、サンプル生体高分子を含むサンプル溶液をカバーガラスに滴下するステップと、プローブ生体高分子が固定されているスライドガラスを該プローブ生体高分子が固定されている面を下にして上記カバーガラスに載置するステップとを備える。

また、サンプル溶液を滴下する前に、シリコン製のシートの上に前記カバーガラスを載置するステップをさらに備えることで、シリコンのガラスとの密着性により、簡単、かつ確実にカバーガラスを所定の位置に固設することができる。

【0008】

本発明のハイブリダイゼーション器具は、生体高分子を固定したスライドグラスを載置する溝を上面に有するトレー部と、前記溝にカバーガラスを固設するためのシートと、前記トレー部を収容するケース部と前記ケース部とで前記トレー部を密閉するキャップ部とを備える。

また、前記シートは、シリコン製であることで、シリコンのガラスとの密着性により、簡単、かつ確実にカバーガラスを所定の位置に固設することができる。

【0009】

また、前記シートは、前記溝と長手方向の長さがほぼ同じであることで、シートを簡単に溝の所定位置に固設することができる。

また、前記シートは、前記カバーガラスを載置する位置を示すガイドラインを有することで、カバーガラスを載置する位置の目安とすることができる。

【0010】

また、本発明のハイブリダイゼーション器具は、生体高分子を固定したスライドグラスを載置する凸部を上面の溝の中に有するトレー部と、前記トレー部を収容するケース部と、前記ケース部とで前記トレー部を密閉するキャップ部とを備える。

また、前記凸部は、カバーガラスを載置する位置を決めるカバーガラス固定溝を有することで、簡単、かつ確実にカバーガラスを所定の位置、すなわち、カバーガラス固定溝14に固設することができる。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、添付図面を参照しながら本発明の好適な実施の形態について詳細に説明する。

図1は、本発明の実施の形態1によるハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。従来例と同様に、トレー一体型キャップ部2は、トレー部4及びパッキン5を有する。本実施の形態におけるハイブリダイゼーション反応法は、図1(b) (図1(a)の断面図)に示すとおり、トレー部4の溝11にシリコン製のシート6を敷き、シート6の上にマークされているガイドライン7に合わせてシート6の上にカバーガラス8を敷き、そのカバーガラス8の上にサンプル溶液9を滴下し、さらにその上にプローブDNAを固定したスライドガラス10を、プローブDNAを固定した側を下にして載せる。溝11にはサンプル溶液の蒸発を防ぐために水を入れる。この状態のトレー一体型キャップ部2をケース部1 (図3参照)に挿入し、とめ具3を用いて密閉する。密閉されたケース部1は、そのまま恒温環境下におき、ハイブリダイゼーション反応させる。反応後は、洗浄作業、染色作業等の過程を経て解析を行う。

【0012】

ここで、実際のトレー一体型キャップ部2は基本的にアクリル製であり、パッキン5がシリコン製である。シート6はシリコン製である。また、溝11の深さは約3mm、シート6の厚みは約1mm、カバーガラス8の厚みは約0.17mmである。スライドガラスは日本規格が $76 \times 26 \text{ mm}^2$ 、米国規格が $3 \times 1 \text{ inch}^2$ (25.4 mm^2)、ヨーロッパ規格が $25 \times 75 \text{ mm}^2$ である。シート6の幅はカバーガラス8の幅よりも短くしてカバーガラス8を載せる作業を容易にすると共に、蒸発を防ぐための水を多く入れることができるようにしている。

【0013】

実施の形態1の効果

(1). サンプル溶液9を間にしてカバーガラス8とスライドガラス10とを合わせる作業において、小さなカバーガラス8をまず固設しておいて、より大きなスライドガラス10を載せるようにしているので、作業としては大きなスライドガラス10を扱うものとなり、小さなカバーガラス8を扱うことに比べて格段に取扱いが容易になる。

(2). シート6の長手方向の長さは溝11の長手方向の長さとはほぼ同じにしているので、シート6を簡単に溝11の所定位置に固設することができる。

(3).シート6はシリコン製であるのでガラスとの密着性がよく、その上にカバーガラス8を載せる際に、簡単、かつ確実に所定の位置、すなわち、ガイドライン7に示される位置に固設することができる。

【0014】

(4).シート6にカバーガラス8を載せる作業において極めて薄いカバーガラス8を万一破損したとしても、まだ、サンプル溶液9を滴下していないので、貴重なサンプルを無駄にすることがない。

(5).シート6がシリコン製で疎水性であるため、溝11に入れられている水でスライドガラス10を濡らすのを防ぐことができる。

(6).スライドガラス10を載せる際は、その長手方向の一端部を溝11の端部に固設してからスライドガラス10の傾斜を減らすようにして載置することになるので、サンプル溶液9の中に気泡が入りにくい。

(7).シート6を溝11の中に入れていたため、蒸発を防ぐための水を十分に入れることができると共に、空気の容積が少なくなり、サンプル溶液9の蒸発を少なくすることができる。

【0015】

図2は、本発明の実施の形態2によるハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。本実施の形態のトレー一体型キャップ部12は、実施の形態1と同様にパッキン15を有すると共に、シート一体型トレー13を有する。このシート一体型トレー13は、実施の形態1のシート6の役割を持つ凸部13aを溝11に有する。したがって、この凸部13aは、溝11の長手方向には端から端まであり、短手方向には中央にだけ存在する。そして、本実施の形態においてはシート6に相当する凸部13aがアクリル製であるので、ガイドライン7の代わりにカバーガラス8を置く位置決めのための溝であるカバーガラス固定溝14を設けている。本実施の形態におけるハイブリダイゼーション反応法は基本的に実施の形態1と同様であるが、シート6を敷く手順が必要なくなり、ガイドライン7に合わせてカバーガラス8を敷くのではなく、カバーガラス固定溝14に合わせてカバーガラス8を敷く点異なる。

【0016】

実施の形態 2 の効果

(1). サンプル溶液 9 を間にしてカバーガラス 8 とスライドガラス 10 とを合わせる作業において、小さなカバーガラス 8 をまず固設しておいて、より大きなスライドガラス 10 を載せるようにしているので、作業としては大きなスライドガラス 10 を扱うものとなり、小さなカバーガラス 8 を扱うことに比べて格段に取扱いが容易になる。

(2). シート一体型トレイ 13 の凸部 13 a にはカバーガラス固定溝 14 を設けているので、凸部 13 a の上にカバーガラス 8 を載せる際に、簡単、かつ確実に所定の位置、すなわち、カバーガラス固定溝 14 に固設することができる。

(3). シート一体型トレイ 13 にカバーガラス 8 を載せる作業において極めて薄いカバーガラス 8 を万一破損したとしても、まだ、サンプル溶液 9 を滴下していないので、貴重なサンプルを無駄にすることがない。

【0017】

(4). スライドガラス 10 を載せる際は、その長手方向の一端部を溝 11 の端部に固設してからスライドガラス 10 の傾斜を減らすようにして載置することになるので、サンプル溶液 9 の中に気泡が入りにくい。

(5). シート一体型トレイ 13 から凸部 13 a が溝 11 の中に突き出ているため、蒸発を防ぐための水を十分に入れることができると共に、空気の容積が少なくなり、サンプル溶液 9 の蒸発を少なくすることができる。

(6). 実施の形態 1 と比べてシート 6 がないだけ、少ない部品点数で実現することができる。

【0018】

なお、本発明は上記実施の形態に限定されるものではない。

例えば、シートは、シリコーン製に限られない。しかし、シートはガラスとの密着性がある、弾力性がある、疎水性で、生化学活性のないものが望ましい。

カバーガラスは、ガラス製に限られず、プラスチック製などでもよい。カバーガラスは、生化学活性のないものが望ましい。

【0019】

【発明の効果】

以上のように、本発明によれば、スライドガラスとカバーガラスとを合わせる作業を特別な技術を要さずに行うことができ、また、サンプル溶液の蒸発を少なくすることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の実施の形態 1 によるハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。

【図 2】

本発明の実施の形態 2 によるハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。

【図 3】

従来のハイブリダイゼーション器具の構成を示す図である。

【図 4】

一体化した状態のハイブリダイゼーション器具の概観を示す図である。

【符号の説明】

- 1 ケース部
- 2 トレー一体型キャップ部
- 3 とめ具
- 4 トレー部
- 5 パッキン
- 6 シート
- 7 ガイドライン
- 8 カバーガラス
- 9 サンプル溶液
- 10 スライドガラス
- 11 溝
- 12 トレー一体型キャップ部
- 13 シート一体型トレー

特 2001-043306

13 a 凸部

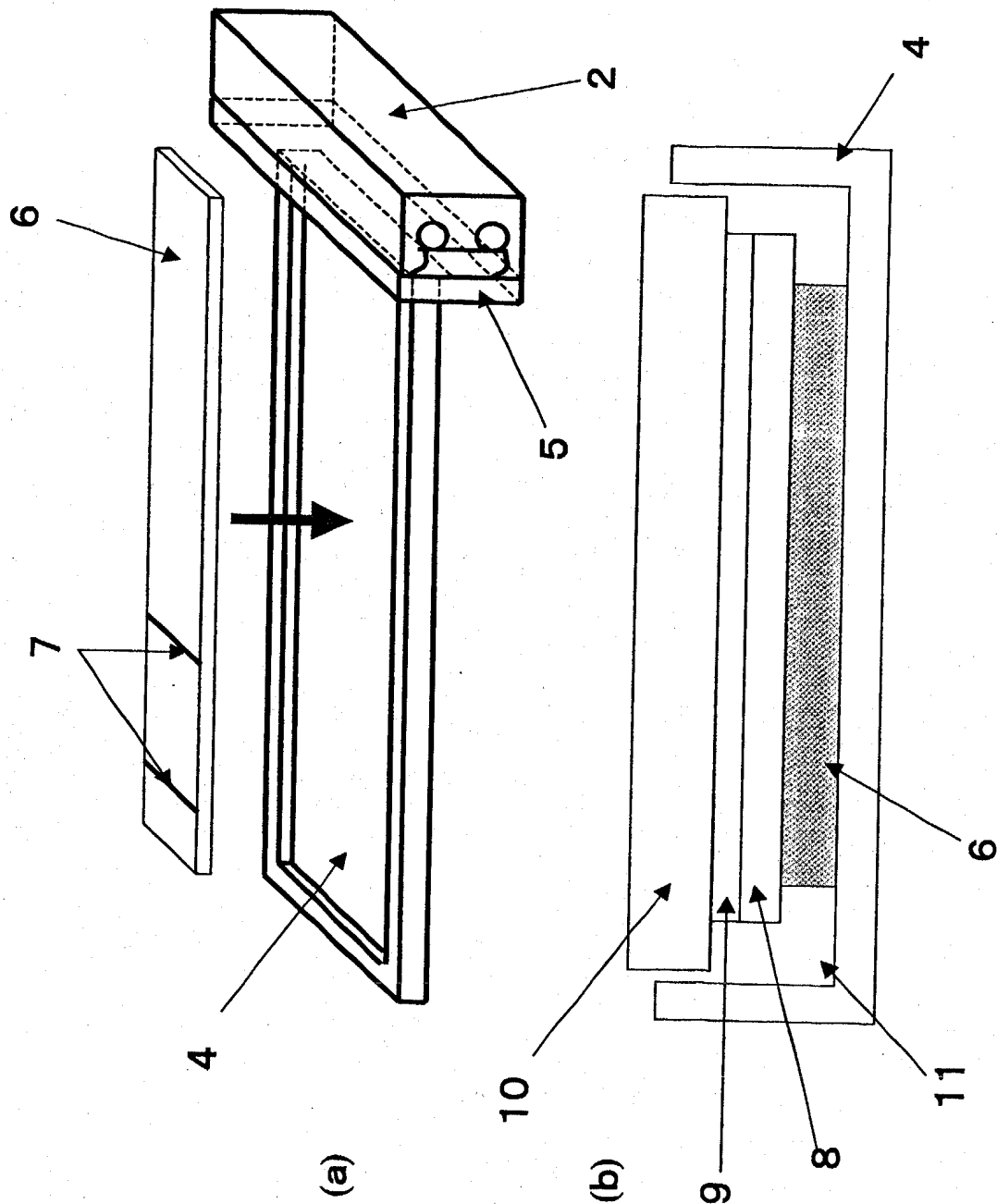
14 カバーガラス固定溝

15 パッキン

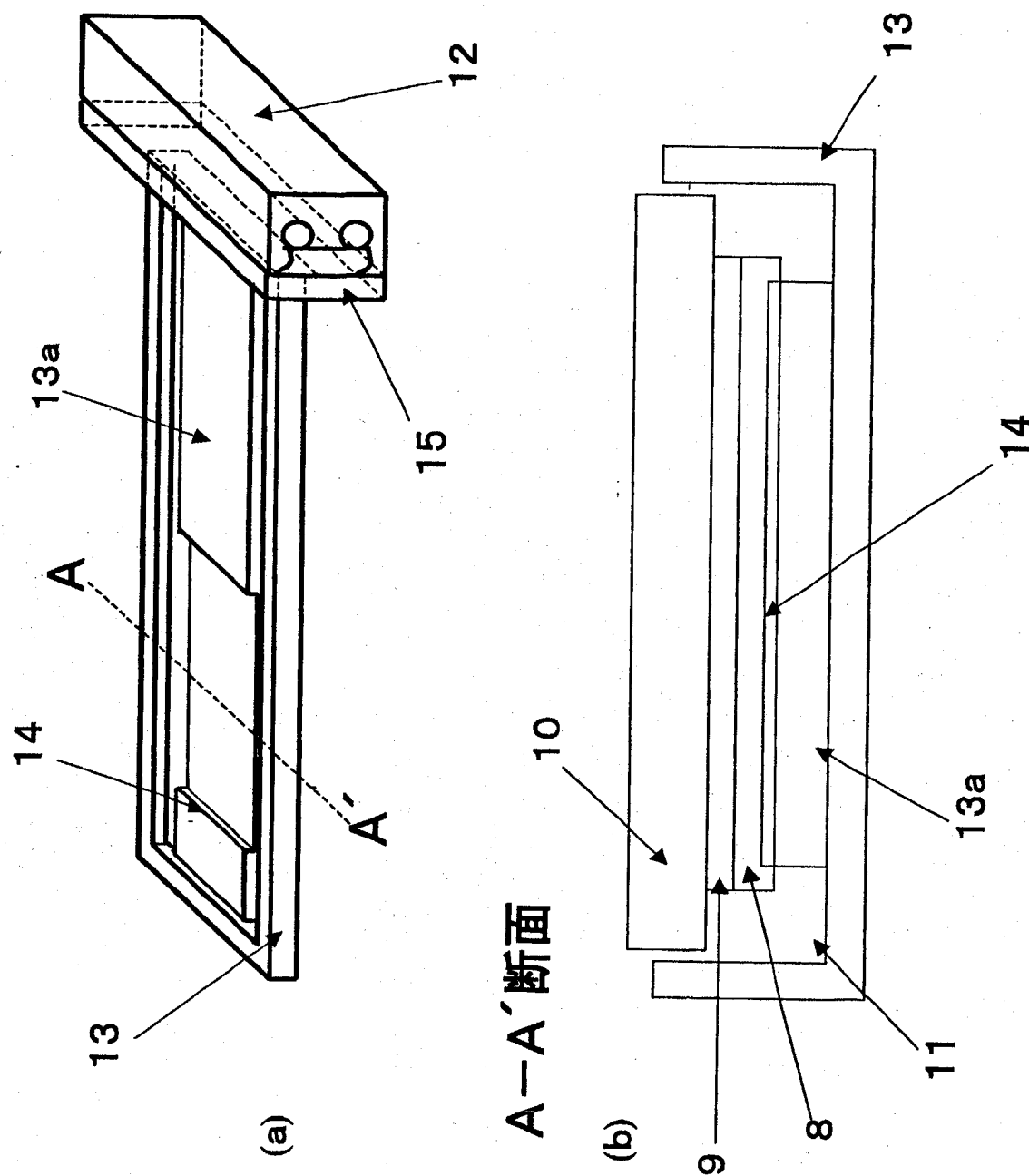
【書類名】

図面

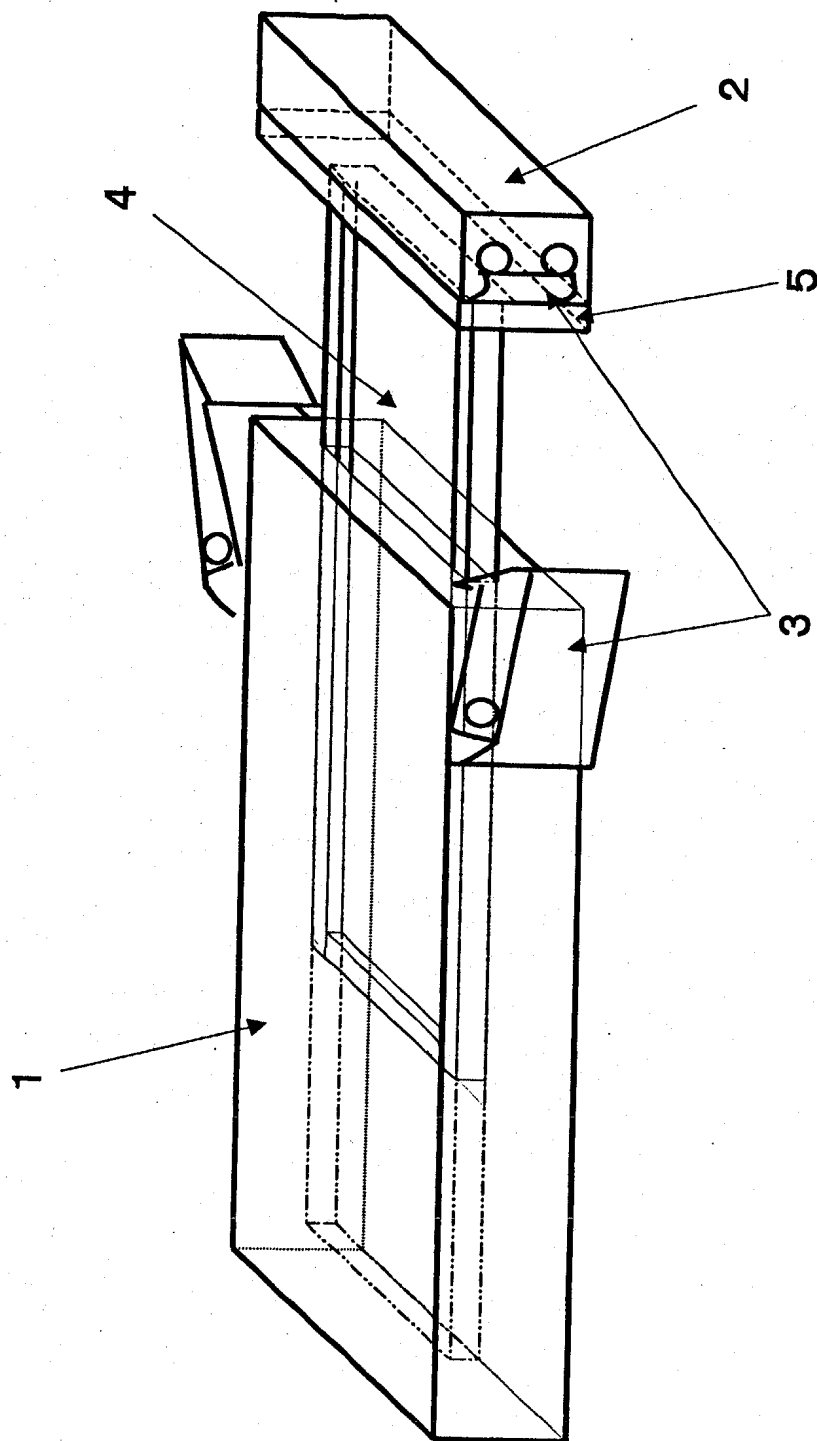
【図1】



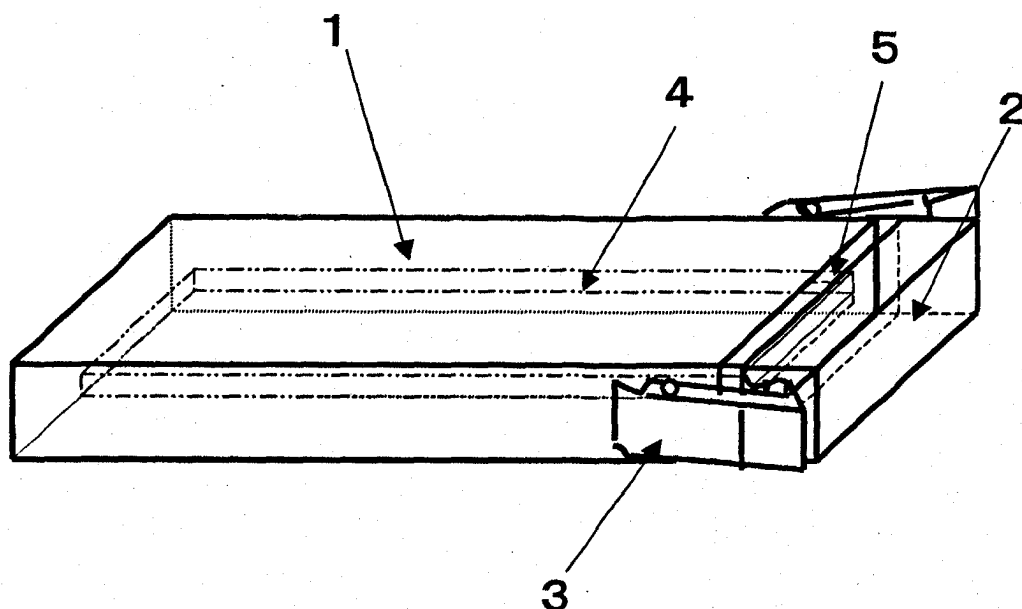
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 誰にでも容易に確実にセットすることができて、かつ、サンプル溶液の蒸発を少なくすることができるハイブリダイゼーション反応法を提供すること。

【解決手段】 トレー部4の溝11にシリコン製のシート6を敷き、シート6の上にマークされているガイドライン7に合わせてシート6の上にカバーガラス8を敷き、そのカバーガラス8の上にサンプル溶液9を滴下し、さらにその上にプローブDNAを固定したスライドガラス10を、プローブDNAを固定した側を下にして載せる。溝11にはサンプル溶液の蒸発を防ぐために水を入れる。この状態のトレー一体型キャップ部2をケース部1に挿入し、とめ具3を用いて密閉する。

【選択図】 図1

特2001-043306

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社